# TTACHMENT

```
RESULT 3
ID ABKGT 3
ID ABKGT 3
ID ABKGT 3
AC ABKG XX
AC ABCG ABAGG CC ABAGG 
Query Match
Best Local Similarity 99.
Matches 953, Conservative
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             G-protein coupled; receptor; liver; central nervous system disease; Alzheiner's disease; anorexia; dementia; metabolic disease; diabetes; hyperlipaemia; cancer; non-emall cell lung cancer; ovarian cancer; stomach cancer; breast cancer; colon cancer; bladder cancer; heausatism; circulatory disease; hypertension; atherosclerosis; angina; allergy; inflammatory disease; respiratory disease; asthma; bronchitis; digestive disease; stomach ulcer; duodenal ulcer; immune disorder; autoimmune disease; infection; acquired immunodeficiency syndrome; AIDS; noncontaction; definition; acquired immunodeficiency syndrome; AIDS;
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        ABK87584,
                                                                                                                                     The invention describes a novel G-protein coupled receptor protein expressed in human liver. The protein is used in the treatment, prevention and diagnosis of contral nervous system diseases (such as prevention and diagnosis of contral nervous system diseases (such as hibetes Alzheimer's, anorexia and dementia), metabolic diseases (such as diabetes and hyperlipaenia), cancer (such as non-small cell lung cancer, ovarian cancer, stomach cancer, breast cancer, colon cancer and bladder cancer), circulatory diseases (such as hypertension, atherosclerosis and angina), inflammacory diseases (such as allergy and rheumatism), respiratory diseases (such as allergy and rheumatism), respiratory diseases (such as athma and bronchitis), disestive diseases (such as stomach ulcer and duodenal ulcer), immune disorders (such as attoinmune diseases), and infections (such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), pneumonia and influenza). This sequence encodes the novel G-protein coupled receptor protein described in the invention
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 DNA encoding novel human G-protein coupled receptor.
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      24-SEP-2002
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          ABK87584 standard;
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     Cbg
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           pneumonia; influenza; gene; 88.
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     WO200257309-A1
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 Homo sapiens.
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     18-JAN-2001; 2001JP-00010814.
30-MAR-2001; 2001JP-00102558.
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 17-JAN-2002; 2002WO-JP000271
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       New G-protein coupled receptor protein expressed in human liver for design of drugs and reagents for treatment and diagnosis of cancer and respiratory metabolic and other diseases.
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       Claim 6, Page 91, 101pp, Japanese
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             WPI; 2002-538457/57.
P-PSDB; AAU98514.
                                                                                                   Sequence
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           (TAKE )
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        TAKEDA CHEM IND LTD.
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         Ito T,
                                                                                                   954 BP; 202
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        (first entry)
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              /tag= a
/product= "Novel G-protein coupled receptor"
/partial
/note= "No stop codon given"
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               Location/Qualifiers
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            Shintani Y, Miyajima
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               CDNA;
                          99.681
                                                                                                 A; 241 C; 214 G;
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               954
  Score 953.6; DB 6;
Pred. No. 1.6e-291;
1; Mismatches 0;
                                                                                                           297
                                                                                                        T; 0 U;
                                                       Length 954;
                                                                                                              0 Other;
                                                                                                                                                                                                                                                                                                             Ś
                                                                                                                                                                                                                                                                   밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         유
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   ঠ
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        문
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       á
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   5
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              S
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          Ś
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 S
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               Ş
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      뎡
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   S
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    S
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        문
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     S
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      Ś
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             용
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       Ś
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 닭
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             ફ
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               밁
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      Ś
                                                                                                                                                                     901
                                                                                                                                                                                                                                                                   841
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        841
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               601
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              541
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                541
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   361
                                                                                                                                                                                                                    901
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         781
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      781
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        721
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          721
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            661
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             661
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 109
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 481
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 481
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  421
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    421
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   361
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     301
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      301
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        241
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       241
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         181
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             121
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           181
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          121
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              13
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             5
                                                                                                                                                                                    TGCAGGCTGAGAGCTGTGCTGAAGAGTCGYCGTTCCTCAAGGTGTGGGACACCT 954
                                                                                                                                                                                                                                                         TGGGAGTCAGTGATTTATCTGTGTGCAGCAGTTCACCCCATCATTCTGCTCTTCAGCAAC
                                                                                                                                                                                                                                                                                           TGGGAGTCAGTGATTTATCTGTGTGCAGCAGTTCACCCCATCATTCTGCTCTTCAGCAAC
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            CTGTCACTGGTGTTCAGTGCTGCAGGTATTTTTCCACCTCTGGACTTTAAATTCTGGGTG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                GCACACATAAAGGCTCTGCTGGCTCTCTCTTTTGCCATGCTCTTCATCTCATATTTC
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              GGAAGACACAGGAAGAAGCTCTCCTTACAACCTCAGGATTCCGAGAGCCCCAGTGTGCAG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   GGAAGACACAGGAAGAAGACCTCCCTTACAACCTCAGGATTCCGAGAGCCCAGTGTGCAG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     ACTTGGACAATGCCCACTGCTGTCTTTTTCATTTGCATGATTTTGCTCATCACATCTCTG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     ATAGGCAACCACAGAATGTATCAGAACTATTTAAGGAACCATCTACAACCTTGGAATGTC
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        CTACCATGGATGCTCTTCAGCTCTGTAGGGCTCTCCAGCTTCACCACCATTCTATTTTTC
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         AAAATTGCTACGTTCACCCACCCTGTCTTCTTCTGGCTAAAGCACAAGTTGTCTGGGTGG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          GACTTCCTGAATGCTGCCACCTTATGGTCCTCTACCTGGCTCAGTGTCTTCTATTGTGTG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         CTGTCACTGGTGTTCAGTGCTGCAGGTATTTTTCCACCTCTGGACTTTAAATTCTGGGTG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        GCACACATAAAGGCTCTGCTGGCTCTCTCTCT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    ACTTGGACAATGCCCACTGCTGTTTTTTCATTTTGCATGATTTTTGCTCATCACACTCTCTG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          CTACCATGGATGCTCTTCAGCTCTGTAGGGCTCTCCAGCTTCACCACCATTCTATTTTTC
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      AAAATTGCTACCTTCACCCACCCTGTCTTCTTCTGGCTAAAGCACAAGTTGTCTGGGTGG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           TTCTTGCATCCGATGGCCTTCCCATACAACCCTGTACTGCAGTTTCTAGCTTTCCAGTGG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               GCTCTGGGCGTGGAGTGGGTGCTACGGAGAATGTTGTTGCCTTGTGATAAGTTATTGGTT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 GTTACCATTTTACTCCTTTTACGCCTGGTAGCAATAGCAGGCAATGGCTTCATCACTGCT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   GTTACCATTTTACTCCTTTTACGCCTGGTAGCAATAGCAGGCAATGGCTTCATCACTGCT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  TGCAGGCTGAGAGCTGTGCTGAAGAGTCGCCGTTCCTCAAGGTGTGGGACACCT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        ACTGGCGATAGCATACGGAGCTACTGTGAGAAATTCTATCTCTTCCCTCTAAAAATGATT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       ATAGGCAACCACAGAATGTATCAGAACTATTTAAGGAACCATCTACAACCTTGGAATGTC
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     GACTTCCTGAATGCTGCCACC
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        TTCTTGCATCCGATGCCCTTCCCATACAACCCTGTACTGCAGTTTCTAGCTTTCCAGTGG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               AGCCTAGGGGCCTCTCGCTTCTGTCTGCAGTCAGTGGTAATGGGTAAGACCATTTATGTT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            AGCCTAGGGGCCTCTCGCTTCTGCAGTCAGTCGGTAATGGGTAAGACCATTTATGTT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  GCTCTGGGCGTGGAGAGCTACGGAGAATGTTGTTGCCTTGTGATAAGTTATTGGTT
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            ATGAATGGAGACCACAIGGTTCTAGGATCTTCGGTGACTGACAAGAAGGCCATCATCTTG
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          TTATGGTCCTCTACCTGGCTCAGTGTCTTCTATTGTGTG
                                                                                                                                                          954
```

Indels

0

Gape

0

900 840 840 780 780 720 720 660 660 600 600 540 540 480 480 420 420 360 360 300 300 240 240 180 180 120 120 60 60

# (19) 世界知的所有権機関 国際事務局



# 

# (43) 国際公開日 2002 年7 月25 日 (25.07.2002)

PCT

# (10) 国際公開番号 WO 02/057309 A1

(51) 国際特許分類7: C07K 14/705, C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 16/28, C12P 21/02, 21/08, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/53, 33/566, A61K 38/00, 45/00, A61P 1/00, 3/00, 5/00, 9/00, 11/00, 25/28, 35/00, 37/00

市 淀川区新高6丁目14番8-606号 Osaka (JP). 宮嶋 伸行 (MIYAJIMA,Nobuyuki) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県 つくば市 吾妻4-16-4 プレビュー吾妻 403 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP02/00271

(22) 国際出願日:

2002年1月17日(17.01.2002)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特顯2001-10814 2001年1月18日(18.01.2001) JF 特顯2001-102558 2001年3月30日(30.03.2001) JF

- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三輪 真敬 (MIWA,Masanori) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県 つくば市 松代 3 丁目 1 2 番地 1 武田松代レジデンス 5 1 3 号 Ibaraki (JP). 伊藤 隆司 (ITO,Takashi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツ704号 Ibaraki (JP). 新谷 靖 (SHINTANI,Yasushi) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府大阪

(74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI,Hiroshi et al.); 〒 104-0028 東京都 中央区 八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

### 添付公開書類:

- 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される 各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語 のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質およびそのDNA

(57) Abstract: It is intended to search for a novel G protein-coupled receptor protein and clarify its function. A novel G protein-coupled receptor protein containing an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or its salt; a polynucleotide encoding the same, etc.; and medicinal use thereof.

(57) 要約:

本発明は、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を検索し、機能を解明することを目的とする。

具体的には、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩およびそれをコードするポリヌクレオチドなどを提供する。それらの医薬用等の用途も提供する。

WO 02/057309 A1

## 明細書

# 新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質およびそのDNA

# 5 技術分野

本発明は、ヒト胎盤由来の新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩およびそれをコードするDNAに関する。

# 背景技術

25

3くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプタータンパク質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプタータンパク質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、Gタンパク質と略称する)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質あるいは7回膜貫通型レセプタータンパク質 (7TMR)と総称される。

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経 伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。

20 レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシ グナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプタータンパク質、特にはGタンパク質共役型レセプタータンパク質との関係を明らかにすることは、各種生体の臓器や細胞の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応する レセプタータンパク質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未

20

25

知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター タンパク質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、 既知のレセプタータンパク質においてもサブタイプが存在するかどうかについて も分かっていないものが多い。

5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプタータンパク質との関係を明らかにすることは、レセプタータンパク質に対するアゴニスト、アンタゴニストを含む医薬品開発に非常に重要な手段である。しかし従来は、レセプタータンパク質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプタータンパク質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

また、近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

従来、Gタンパク質共役型レセプターとそのリガンドである生理活性物質との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるGタンパク質共役型レセプタータンパク質を新規に見出し、その遺伝子(例えばcDNA)をクローニングすることは、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、Gタンパク質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のGタンパク質共役型レセプター、またそのリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新

20

たなGタンパク質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

Gタンパク質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新た なリガンド(生理活性物質)の探索、また、該レセプターに対するアゴニストま たはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されな くても、該レセプターの不活化実験(ノックアウト動物)から該レセプターの生 理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴ ニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、ア ゴニストまたはアンタゴニストなどは、Gタンパク質共役型レセプターの機能不 全に関連する疾患の予防/治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、Gタンパク質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での 10 該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合 も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投 与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内(またはある特定の臓器)への導入 や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に 応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失 15 や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、 該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防/治療薬や診断薬に応用すること もできる。

本発明は、上記のように有用な新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質 を提供するものである。すなわち、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク 質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該Gタンパク質共役型レセプタータ ンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNA、RN Aおよびそれらの誘導体)を含有するポリヌクレオチド (DNA、RNAおよび それらの誘導体)、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えべ クターを保持する形質転換体、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質また 25 はその塩の製造法、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部 分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該Gタンパク質共役型レセプタータンパ ク質の発現量を変化させる化合物、該Gタンパク質共役型レセプターに対するリ ガンドの決定方法、リガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との 結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)またはその塩、およびリガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)もしくは該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

# 10 発明の開示

15

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト胎盤由来の新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする c DNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1~第7膜貫通領域が図1に示される疎水性プロット上で確認され、これらの c DNAにコードされるタンパク質が7回膜貫通型のGタンパク質共役型レセプタータンパク質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア 20 ミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク 質またはその塩:
  - (2) 配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質:
- (3) 上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプ 25 チドまたはその塩:
  - (4) 上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド;
  - (5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド;
  - (6) 配列番号:2で表される塩基配列を含有する上記(5)記載のDNA;

- (7) 上記 (4) 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター;
- (8) 上記 (7) 記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体;
- (9) 上記 (8) 記載の形質転換体を培養し、上記 (1) 記載のGタンパク質 共役型レセプタータンパク質またはその塩を生成せしめることを特徴とする上記
- 5 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法;
  - (10) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは 上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体;
  - (11) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(10)記載の抗体;
- 10 (12) 上記 (10) 記載の抗体を含有してなる診断薬;
  - (13) 上記(10)記載の抗体を含有してなる医薬;
- (14) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることにより得られうる上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド;
  - (15) 上記(14)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質または その塩に対するリガンドを含有してなる医薬;
- (16) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは 上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする上記 (1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリ ガンドの決定方法;
  - (17) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは 上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガ ンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩 との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法;
  - (18) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット;

ŗ,

10

15

- (19) 上記 (17) 記載のスクリーニング方法または上記 (18) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩;
- 5 (20) 上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬;
  - (21) 上記(4)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下 でハイブリダイズするポリヌクレオチド;
  - (22) 上記(4)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド;
  - (23) 上記(4)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のmRNAの定量方法。
  - (24) 上記(10)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載の Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の定量方法;
- (25) 上記 (23) または (24) 記載の定量方法を用いることを特徴とする上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断 20 方法。
  - (26) 上記 (23) 記載の定量方法を用いることを特徴とする上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法;
- (27) 上記 (24) 記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜におけ 25 る上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化 合物またはその塩のスクリーニング方法;
  - (28) 上記 (26) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化 合物またはその塩;

- (29) 上記(27)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜に おける上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させ る化合物またはその塩;
- (30) 上記(28)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬;
- 5 (31) 上記(29)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬;
  - (32) 中枢性疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、循環器疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、炎症性疾患または感染症の予防・治療剤である上記 (13)、(15)、(20)、(30)または(31)記載の医薬;
- (33) 哺乳動物に対して、上記(19)、(28)または(29)記載の化 10 合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、 代謝疾患、癌、循環器疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、炎症性 疾患または感染症の予防・治療方法;
- (34) 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、循環器疾患、呼吸器系疾患、 消化器系疾患、免疫系疾患、炎症性疾患または感染症の予防・治療剤を製造する 15 ための上記(19)、(28)または(29)記載の化合物またはその塩の使用 等に関する。

さらには、

- (35) タンパク質が、①配列番号:1で表わされるアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩、
  - (36)上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは

のリガンドの決定方法、

25

その塩または上記 (3) 記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記 (16) 記載のリガンドの決定方法、

- (37) リガンドが、例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド 、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチド Y、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、P ACAP27、PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、ア ドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、P TH、VIP (バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド)、ソマトス タチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシト ニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、 10 プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカイン スーパーファミリー (例、IL-8、GROα、GROβ、GROγ、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサプファミリ -; MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3  $\alpha$  /LARC, MIP-3  $\beta$  /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2 15 、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー;lymphotactin などのCケモカインサブファミリー; fractalkineなどのCX3Cケモカインサ プファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロ テンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスフ ァチジン酸 (LPA) またはスフィンゴシン1-リン酸である上記(36)記載 20
  - (38) (i) 上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記 (3) 記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記 (3) 記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記 (17) 記載のスクリーニング方法、
  - (39) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくは

その塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3) 記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3) 記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- (40) (i) 標識したリガンドを上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (41) (i) 標識したリガンドを上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (42) (i) 標識したリガンドを上記(8) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(8) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合における、標識したリガンドの該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レ

10

セプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の スクリーニング方法、

- (43) (i) 上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (44)上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接15 触させた場合と、上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合における、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (45) 上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、PACAP27、PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレー

ティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンポキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー (例、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー; MCAF/MCP-1、

- 5 MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1α、MIP-1β、HCC-1、MIP-3α
  /LARC、MIP-3β/ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DCCK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサプファミリー; lymphotactinなどのCケモカ
  インサプファミリー; fractalkineなどのCX3Cケモカインサプファミリー等)、
  エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、
- 10 パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA) またはスフィンゴシン1-リン酸である上記(43)または(44)記載のスクリーニング方法、
- (46) 上記 (38) ~ (45) 記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
  - (47) 上記 (38) ~ (45) 記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記 (1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、
- (48) 上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有す 20 る細胞を含有することを特徴とする上記(18)記載のスクリーニング用キット
  - (49) 上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(18)記載のスクリーニング用キット、
- 25 (50)上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の 細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有することを特 徴とする上記(18)記載のスクリーニング用キット、
  - (51) 上記(48)  $\sim$  (50) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質

20

またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- (52) 上記(48) ~ (50) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、
- (53) 上記(10) 記載の抗体と、上記(1) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3) 記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記(1)のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、
- (54)上記(10)記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および
  - (55)被検液と担体上に不溶化した上記(10)記載の抗体および標識化された上記(10)記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法等を提供する。

### 図面の簡単な説明

図1は、TGR31の疎水性プロット図である。

25 図2は、TGR31のヒト組織における発現分布解析図である。

# 発明を実施するための最良の形態

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質(以下、レセプタータンパク質と略記する場合がある)は、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一

25

もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である。 本発明のレセプタータンパク質は、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物(例えば、 モルモット、ラット、マウス、ウサギ、プタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあら ゆる細胞 (例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メ サンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽 細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、 巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞 もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など ) や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、 10 脳の各部位(例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核 、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殼、尾状核、脳染、黒質 )、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副 腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臟、顎 下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、 15 骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であって もよい。

配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達 作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質である ことを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性

が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2 倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの 量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に 5 準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するリガンドの決定方法やスク リーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプタータンパク質としては、①配列番号:1で表わされる
アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましく
は1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失したア
10 ミノ酸配列、②配列番号:1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個
(1~5個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が他のアミノは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

本明細書におけるレセプタータンパク質のアミノ酸配列は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をはじめとする、本発明のレセプタータンパク質は、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COOT)、Cアミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル (-COOR) のいずれであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、nープロピル、イソプロピルもしくはnーブチルなどの $C_{1-\theta}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $C_{3-\theta}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ ーナフチルなどの $C_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニルー $C_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ ーナフチルメチルなどの $\alpha$ ーナフチルー $C_{1-2}$ アルキル基などの $C_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプタータンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

5 さらに、本発明のレセプタータンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC2-6アルカノイル基などのC1-6アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC2-6アルカノイル基などのC1-6アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のレセプタータンパク質の具体例としては、例えば、配列番号:1で表 15 わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質などが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質の部分ペプチド(以下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、上記した本発明のレセプタータンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプタータンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質の活性を有するものなどが用いられる。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、例えばリガンド結合活性を示す。リガンド結合活性の測定は上記と同様に行なうことができる。

具体的には、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプタータンパク質の部分ペプチドとしては、図1に示される疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでもよい。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸数は、上記した本発明のレセプタータンパク

15

20

25

質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

また、本発明の部分ペプチドは、①上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、 $1\sim10$ 個程度、さらに好ましくは数個( $1\sim5$ 個))のアミノ酸が欠失し、②上記アミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、 $1\sim20$ 個程度、

10 より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が付加し、または③上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1~5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドのC末端は、カルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COOT)、アミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)のいずれであってもよい(Rは前記と同意義を示す)。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプタータンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、酸また は塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される 酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リ ン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロ

ピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩は、上記したヒトや非ヒト哺乳動物の細胞または組織から公知のレセプタータンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳 10 動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液 を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラ フィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩または そのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができ る。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹 脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4ーベンジルオキシベンジ ルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロ キシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、 4- (2',4'-ジメトキシフェニルーヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4- ( 2',4'ージメトキシフェニルーFmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げる 20 ことができる。このような樹脂を用い、αーアミノ基と側鎖官能基を適当に保護 したアミノ酸を、目的とするタンパク質またはペプチドのアミノ酸配列通りに、 公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパ ク質またはペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液 中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分 25 ペプチドまたはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'ージイソプロピルカルボジイミド、N-エチルーN'ー

25

(3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOOBt) とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質 縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、 N.Nージメチルホルムアミド, N,Nージメチルアセトアミド, Nーメチルピロリド . ンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類 、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのス 10 ルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、 アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチル などのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は タンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択さ れ、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導 15 体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果 、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すこと により十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得ら れないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸 をアセチル化することができる。 20

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、2、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4ーメトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

. カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、プチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステ

15

20

25

ル、4ーニトロベンジルエステル、4ーメトキシベンジルエステル、4ークロロベ ンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジ ルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリープトキシカルボニルヒドラジド 化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護するこ とができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低 級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル 基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また 、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル 10 基、tープチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl,-Bzl、2 ーニトロベンジル、Br-Z、ターシャリープチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4ーメトキシー 2.3.6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc 、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水 物、アジド、活性エステル〔アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、 2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコ ール、パラニトロフェノール、HONB、Nーヒドロキシスクシミド、Nーヒドロキシ フタルイミド、HOBt) とのエステル] などが用いられる。原料のアミノ基の活性 化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触 媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスル ホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混 合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピ ペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムに よる環元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約−20℃~40 ℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール 、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、

10

1,4-プタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の 添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる 2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-プタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護 基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から 適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のαーカルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(タンパク質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のαーアミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のαーカルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

25 本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を

有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①~⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis). Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
  - ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
  - ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 蛋白質の化学IV、205、
- 10 (1977年)

15

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のレセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のレセプタータンパク質をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該 20 ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA: RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

25 本発明のレセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法、例えば、TaqMan PCRなどの方法により、本発明のレセプタータンパク質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、

ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のレセプタータンパク質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプタータンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号:2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号:2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイプリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、 20 モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

25 該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 m M、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタ

ータンパク質をコードするDNAとしては、配列番号:2で表わされる塩基配列 を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAの塩基配列の一部、または 該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記 の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAを も包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の複製また は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)を、ク ローン化した、あるいは決定されたGタンパク質共役型レセプタータンパク質を コードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌ 10 クレオチド (核酸) は、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子のRN Aとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害すること ができるか、あるいはGタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNAとの 相互作用を介してGタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の発現を調節 ・制御することができる。Gタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNA 15 の選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびGタンパク質共役型レセ プタータンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌ クレオチドは、生体内および生体外でGタンパク質共役型レセプタータンパク質 遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断 に有用である。また、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の5'端 20 ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプ チド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳 領域、3、端パリンドローム領域、および3、端へアピンループは好ましい対象領 域として選択しうるが、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子内の如 何なる領域も対象として選択しうる。 25

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係、即ち、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2ーデオキシーDーリボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D

10

15

20

25

ーリボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN ーグリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチ ド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販のタンパク質核酸および合成配 列特異的な核酸ポリマー)または特殊な結合を含有するその他のポリマー(但し 、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の 付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それら は、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA :RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド(また は非修飾オリゴヌクレオチド)、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば 当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたも の、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチ ド修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホスホ トリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど)を持つもの、電荷を有 する結合または硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエ ートなど)を持つもの、例えばタンパク質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・イン ヒピター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリジンなど)や糖( 例えば、モノサッカライドなど) などの側鎖基を有しているもの、インターカレ ント化合物 (例えば、アクリジン、ソラレン (psoralen) など) を持つもの、キ レート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など ) を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの( 例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、 「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有する のみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良 い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化され たプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。 修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾され ていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換さ れていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

いは修飾された核酸 (RNA、DNA) である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

このような修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結 合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与 されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることが 15 できうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を 中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を 高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピド、コ レステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂 質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロロホルメ 20 ート、コール酸など) が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着さ せることができうる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的 に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレ アーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基 25 としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコー ルをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限 定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体

10

20

25

外の遺伝子発現系、あるいはGタンパク質共役型レセプタータンパク質の生体内 や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は、公知の各種の方法で 細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接RTーPCR法によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(
1) 配列番号: 2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有する
DNA、または(2) 配列番号: 2で表わされるDNAとハイストリンジェント
な条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のタンパク質ペプチドと実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号:2で表わされるDNAとハイストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号:2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド(以下、本発明のレセプタータンパク質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプタータンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼ

ーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning ) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km (宝酒造(株))、Mutan™-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプタータンパク質をコードするDNAは目的によりその まま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用 することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATG を有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTA Gを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合 成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

15 本発明のレセプタータンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含む、例えばcDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194 )、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、 λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウ

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pCR4、pCR2.1、pBR322、

イルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応 して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿 主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプ ロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好

ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモー ター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主が バチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモ ーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター 、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞で ある場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシ グナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、S V40oriと略称する場合がある) などを含有しているものを用いることができ る。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称 10 する場合がある) 遺伝子 [メソトレキセート (MTX) 耐性] 、アンピシリン耐 性遺伝子(以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下 、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、CHO(dhfr -) 細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含 まない培地によっても目的遺伝子を選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプタータン パク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シ グナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α ーアミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母 である場合は、 $MF\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞 20 である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ ーインターフェロン・シグナ ル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA を含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、 25 昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli ) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サ イエンシイズ・オプ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻 , 160 (1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440 (1954)], DH5 α [Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)], DH10B [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4645-4649 (1990)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズプチルス (Bacillus subtilis ) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オプ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913、NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来 株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由 20 来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™ 細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイ ルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞)などが 用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217 (1977))な どが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスタ

15

一細胞CHO(以下、CHO(dhfr)細胞と略記)、マウス上細胞,マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972)やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メッソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55 (1988))などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロ 20 トコール、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻 、456 (1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDN Aを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養 25 に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生 育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては 、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源として は、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン 、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、 無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミ ノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

10 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない 、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホ 15 ールダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L. ら、「プロシージングズ・ オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエ スエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)」や0.5%カザミノ 酸を含有するSD培地 (Bitter, G. A. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナ ショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (

20 Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984) 」が挙げられる。培地のp Hは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間 行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788

25 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のp Hは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science),122巻,501

(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], R PMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・

バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のGタ 10 ンパク質共役型レセプタータンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプタータンパク質を分離精製するには、例えば、 下記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプタータンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプタータンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100mなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプタータンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌のあるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプタータンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

このようにして得られるレセプタータンパク質が遊離体で得られた場合には、 公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩 で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または 他の塩に変換することができる。

- 5 なお、組換え体が産生するレセプタータンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。
- 10 このようにして生成する本発明のレセプタータンパク質またはその塩の活性は 、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッ セイなどにより測定することができる。

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその15 塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある)に対する抗体は、本発明のレセプタータンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

20

25

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプタータンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

10

15

20

25

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプタータンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法[ネイチャー(Nature)、256巻、495頁(1975年)]に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、約20~40℃、好ましくは約30~37℃で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプタータンパク質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプタータンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い

。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))またはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

## (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同 10 様に免疫グロブリンの分離精製法 [例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿 法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲ ルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸 着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法] に従 って行なうことができる。

### 15 [ポリクローナル抗体の作製]

20

25

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって 製造することができる。例えば、免疫抗原(本発明のタンパク質等の抗原)とキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と 同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプタータンパク質 等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることが

15

20

できるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チ オール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは 担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全 フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投 与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同 様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル 抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができ る。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩 、および該レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAは 、(1) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンド( アゴニスト)の決定、(2)本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質 の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3)遺伝子診断剤、 (4) 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化さ せる化合物のスクリーニング方法、(5) 本発明のレセプタータンパク質または その部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および /または治療剤、(6) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対 するリガンドの定量法、(7)本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク 質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど ) のスクリーニング方法、(8) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパ ク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニスト) 25 を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(9) 本発明のレセプタータ ンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、(10)細胞膜における 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物 のスクリーニング方法、(11)細胞膜における本発明のレセプタータンパク質ま

15

たはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および /または治療剤、 (12) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチ ドまたはその塩に対する抗体による中和、 (13) 本発明のGタンパク質共役型レ セプタータンパク質をコードするDNAを有する非ヒトトランスジェニック動物 の作製などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現系を 用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや非ヒト哺乳動物 に特異的なGタンパク質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させ る化合物(例、アゴニスト、アンタゴニストなど)をスクリーニングすることが でき、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして 使用することができる。

本発明のレセプタータンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある)、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)および本発明のレセプタータンパク質等に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

(1) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンド( 20 アゴニスト)の決定

本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドも しくはその塩は、本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド (アゴニスト)を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本 25 発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴と する本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド(例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、P

25

ACAP (例、PACAP 27、PACAP 38) 、セクレチン、グルカゴン、 カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、AC TH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミ リン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド) 5 、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン 、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、IL-8、GR Oα, GROβ, GROγ, NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー; MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3 , MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ 10 /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどの CCケモカインサプファミリー;lymphotactinなどのCケモカインサプファミリ ー; fractalkineなどのCX3ケモカインサプファミリー等)、エンドセリン、 エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティ ックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴ 15 シン1-リン酸など)の他に、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物(例えば、マ ウス、ラット、プタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清な どが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプタ ータンパク質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一 のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプタータンパク質も しくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター タンパク質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用 いることによって、本発明のレセプタータンパク質に結合して細胞刺激活性(例 えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²+遊離、細胞内cAMP生 成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパ ク質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する 活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、 合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法である。

20

25

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプタータンパク質または その部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプタータ ンパク質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性な どを測定することを特徴とする。

5 より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩また は本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試 験化合物の該タンパク質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩 に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質また はその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞また は該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞また は該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプタータン パク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

3標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプタータンパク質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた 場合における、レセプタータンパク質を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を 測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対する リガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質に接触させた場合における、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性(例え

10

ば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①~③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプタータンパク 質に結合することを確認した後に、上記④~⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるレセプタータンパク質としては、上記した本 発明のレセプタータンパク質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれ ば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプタータ ンパク質が適している。

本発明のレセプタータンパク質を製造するには、上記の発現方法が用いられる が、該レセプタータンパク質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発 現することにより行なうことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードす 15 るDNA断片には、通常、cDNAが用いられるが、必ずしもこれに制約される ものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセ プタータンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効 率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルス に属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘ ドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモー 20 ター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイ トメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが 好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる 。例えば、文献 (Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミ ストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法 25 に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその

塩であってもよいし、該レセプタータンパク質を含有する細胞またはその細胞膜 画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞としては、本発明のレセプター タンパク質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌 、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜面分としては、細胞を破砕した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く 含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter—Elvehjen型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製)による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法 が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500~3000 rpm)で短時間 (通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000~30000 rpm)で通常 30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

20 該レセプタータンパク質を含有する細胞やその膜画分中のレセプタータンパク質の量は、1細胞当たり10<sup>3</sup>~10<sup>8</sup>分子であるのが好ましく、10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

25 本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する上記 の①~③の方法を実施するためには、適当なレセプタータンパク質画分と、標識 した試験化合物が必要である。

レセプタータンパク質画分としては、天然型のレセプタータンパク質画分か、 またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここ

25

で、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、[³H]、[¹²5I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識 したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタ ミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バ ソプレッシン、オキシトシン、PACAP (例、PACAP 27、PACAP 3 8)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトス タチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(パソアクティ プ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン 、ドーパミン、モチリン、アミリン、プラジキニン、CGRP(カルシトニンジ 10 ーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロス **タグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパ** ーファミリー (例、IL-8、GROα、GROβ、GROγ、NAP-2、ENA-78、 GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー; MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, HCC-15 1, MIP-3 α/LARC, MIP-3 β/ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC 、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサプファミリー;lymphotactinなどの Cケモカインサプファミリー; fractalkineなどのCX3ケモカインサプファミ リー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン

具体的には、本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの 決定方法を行なうには、まず本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞また は細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプタ ー標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどのリガンドとレセプタータンパク 質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80™(花王ーアトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなど

、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン

酸 (LPA)、スフィンゴシン1-リン酸などが好適である。

10

の各種タンパク質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10 mlの該レセプター溶液に、一定量(5000~500000 cpm)の〔³H〕、[¹ºol]、[⁵sl] などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃~50℃、望ましくは約4℃~37℃で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγーカウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0 cpmを越える試験化合物を本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)として選択することができる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する上記 の④~⑤の方法を実施するためには、該レセプタータンパク質を介する細胞刺激 15 活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²\*遊離、細胞 内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞 内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性また は抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定する ことができる。具体的には、まず、レセプタータンパク質を含有する細胞をマル 20 チウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新 鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物 などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回 収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標 とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素に 25 よって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行な ってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで 細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出す ることができる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞、または本発明のレセプタータンパク質を含有するものである。

- 5 本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。
  - 1. リガンド決定用試薬
  - ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

- 10 孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調 製しても良い。
  - ②Gタンパク質共役型レセプタータンパク質標品

本発明のレセプタータンパク質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37°C、5 %  $CO_2$ 、95% airで2日間培養したもの。

15 ③標識試験化合物

市販の [<sup>3</sup>H] 、 [<sup>125</sup>I] 、 [<sup>14</sup>C] 、 [<sup>35</sup>S] などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液に て1 μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルム アミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

20

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプタータンパク質発現C 25 Η Ο 細胞を、測定用緩衝液 1 mlで 2 回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各 穴に加える。
  - ②標識試験化合物を5 µ1加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 µ1加えておく。
    - ③反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識

試験化合物を0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4 mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマンコールター社製) を用いて放射活性を測定する。

- 5 本発明のレセプタータンパク質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、視床下部、大脳皮質、結腸癌、肺癌、心臓、胎盤、肺などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、
- 10 PACAP (例、PACAP 2 7、PACAP 3 8) 、セクレチン、グルカゴン 、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、A CTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリ ン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、
- 15 ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、IL-8、GROα、GROβ、GROγ、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー; MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1α、MIP-1β、HCC-1、MIP-3α/LARC、MIP-3β/ELC、I-
- 20 309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー; lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー; fractalkineなどのCX 3 ケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴシン1-リン酸などが用いられる。
  - (2) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤
    - 上記 (1) の方法において、本発明のレセプタータンパク質に対するリガンド

25

が明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質をコードするDNAを、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として使用することができる。

5 例えば、生体内において本発明のレセプタータンパク質が減少しているために リガンドの生理作用が期待できない(該レセプタータンパク質の欠乏症)患者が いる場合に、①本発明のレセプタータンパク質を該患者に投与し該レセプタータ ンパク質の量を補充したり、②(イ)本発明のレセプタータンパク質をコードす るDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)対象となる 10 細胞に本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを挿入し発現させた後 に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプタ ータンパク質の量を増加させたりして、リガンドの作用を充分に発揮させること ができる。すなわち、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAは、安 全で低毒性な本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防お よび/または治療剤として有用である。

ク質、例えば、ロドプシン(アミノ酸レベルの相同性が23%)(CRANDALL K.A., and HILLIS D.M. NATURE 387:667-668(1997))、5 ーヒドロキシトリプタミンレセプター(WITZ P., AMLAIKY N., PLASSAT J.-L., MAROTEAUX L., BORRELLI E., and HEN R. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 87:8940-8944(1990))、CCーケモカインレセプター(Bonini, J.A., Martin, S.K., Dralyuk, F., Roe, M. W., Philipson, L. H. and Steiner, D. F. "Cloning, expression, and chromosomal mapping of a novel human CC-chemokine receptor (CCR10) that displays high-affinity binding for MCP-1 and MCP-3" DNA Cell Biol. 16 (10), 1249-1256 (1997))、ド型オピオイドレセプター(CHEN Y., MESTEK A., LIU J., and YU L. BIOCHEM. J. 295:625-628(1993): MINAMI M., TOYA T., KATAO Y., MAEKAWA K., NAKAMURA S., ONOGI T., KANEKO S., and SATOH M. FEBS LETT. 329:291-295(1993): LI S., ZHU J., CHEN C., CHEN Y.-W., DERIEL J.K., ASHBY B., and LIU-CHEN L.-Y. BIOCHEM. J. 295:629-633(1993))にアミノ酸

本発明のレセプタータンパク質は、低分子をリガンドとするレセプタータンパ

10

15

20

25

配列レベルで相同性が認められる新規7回膜貫通型レセプタータンパク質である

本発明のレセプタータンパク質または該レセプタータンパク質をコードするDNAは中枢疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、内分泌疾患(例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など)、代謝疾患(例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など)、癌(例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌など)、循環器疾患(例えば、狭心症、心筋梗塞など)、呼吸器系疾患(例えば、気道閉塞性疾患、感染性肺疾患など)、消化器系疾患(例えば、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃炎、逆流性食道炎など)、免疫系疾患(例えば、自己免疫性疾患など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー、喘息、リュウマチなど)、感染症(例えば、免疫機能不全、肺炎、インフルエンザなど)などの予防および/または治療に有用である。

本発明のレセプタータンパク質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常 套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤

実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。 これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるように するものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ チン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨 化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物 10 は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産 出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他 の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナト リウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エ 15 タノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコ ール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80™、HCO-50)などと併用 してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補 助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

20 また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

本発明のレセプタータンパク質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与 方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60

10

15

kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより 差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者 (60 kgとして) にお いては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは 約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、 対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通 常例えば、癌患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01~30 mg程度、 好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射によ り投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を 投与することができる。

# (3) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは非ヒト哺 20 乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常 (遺伝子異常) を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用で ある。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics),第5巻,874~879頁 (1989年)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy

25

of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年)) などにより実施することができる。

(4) 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化 5 させる化合物のスクリーニング方法

本発明のDNAは、プロープとして用いることにより、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器 10 、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定する ことによる、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を 変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は 15 具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肺、大腸など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段によりノザンブロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析するこ

とができる。

5

10

15

20

25

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる 化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前(30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前)もしくは一定時間後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、細胞に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、
- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、 一定時間培養後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましくは 2日後~3日後)、該形質転換体に含まれる本発明のレセプタータンパク質また はその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ る。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、Gタンパク質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(ロ)本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、 発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公 知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

5 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

- (5) 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化 させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤
- 25 本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

10

15

20

25

該化合物を本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ チン、コーンスターチ、トラガント、アラピアゴムのような結合剤、結晶性セル ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨 化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物 は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産 出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他 の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナト リウムなど) などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール (例、エ タノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコ ール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80™、HCO-50)などと併用 してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補 助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイ

ンなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒ 5 ト哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イ ヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌症患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(6) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドの 定量法

本発明のレセプタータンパク質等は、リガンドに対して結合性を有しているの 20 で、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプタータンパク質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

- ①入江寬編「ラジオイムノアッセイ」 (講談社、昭和49年発行)
- ②入江寬編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)
  - (7) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合

性を変化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニストなど) のスクリーニング方 法

本発明のレセプタータンパク質等を用いるか、または組換え型レセプタータンパク質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物(例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる

20 すなわち、本発明は、(i) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、例えば、該レセプタータンパク質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

10

15

20

25

①標識したリガンドを、本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプタータンパク質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプタータンパク質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物(例えば、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドなど)を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca\*\*遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および⑤本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物(例えば、本発明のレ

15

20

25

セプタータンパク質等に対するリガンドなど)を本発明のDNAを含有する形質 転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク 質等に接触させた場合と、本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物 および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによっ て細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合におけ る、レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコ リン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリ ン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較すること を特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させ る化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプタータンパク質等が得られる以前は、Gタンパク質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て(一次スクリーニング)、その後に該候補化合物が実際にヒトのGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験(二次スクリーニング)が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプタータンパク質も混在するために、目的とするレセプタータンパク質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際に直接的にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプタータンパク質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプタータンパク質等 としては、上記した本発明のレセプタータンパク質等を含有するものであれば何 れのものであってもよいが、本発明のレセプタータンパク質等を含有する哺乳動

10

15

20

25

物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプタータンパク質等などが適している。

本発明のレセプタータンパク質等を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片にはcDNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を

昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR のプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.),267巻,19555~19559頁,1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプタータンパク質等を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプタータンパク質等であってもよいし、該レセプタータンパク質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプタータンパク質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプタータンパク質等を含 有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定 化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞としては、該レセプタータンパク質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く

25

含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞 膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500~3000 rpm)で短時間(通常、約1~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000~30000 rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質等と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプタータンパク質等を含有する細胞や膜画分中のレセプタータンパク質の量は、1細胞当たり10<sup>3</sup>~10<sup>8</sup>分子であるのが好ましく、10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>分子であるのが好ましく、20<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物を スクリーニングする上記の①~③を実施するためには、例えば、適当なレセプタ ータンパク質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプタータンパク質画分としては、天然型のレセプタータンパク質画分か、 20 またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプタータンパク質画分などが望ま しい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作 用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば  $[^{8}H]$  、  $[^{125}I]$  、  $[^{14}C]$  、  $[^{55}S]$  などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに 懸濁することによりレセプタータンパク質標品を調製する。バッファーには、p

25

H4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸パッファー、トリスー塩酸パッファ 一などのリガンドとレセプタータンパク質との結合を阻害しないバッファーであ ればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、 Tween-80™ (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活 性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプタ 5 ーやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研 究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。 0.01~10 mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000~500000 cpm) の標識したリ ガンドを添加し、同時に10<sup>-1</sup>~10<sup>-10</sup> Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合 量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用 10 意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時 間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適 量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シン チレーションカウンターまたはγーカウンターで計測する。拮抗する物質がない 場合のカウント (B₀) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B₀-N 15 SB) を100%とした時、特異的結合量 (B-NSB) が、例えば、50%以下にな る試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④~⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²\*遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標

とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素に よって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行な ってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで 細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出す ることができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプタータンパク質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプタータンパク質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプタータンパク質等を有する細胞株、上記の組換え型レセプタータンパク質等を発現した細胞株などが望ましい。

10 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物ま 15 たはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプタータンパク質等、本 発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞、または本発明のレセプタータン パク質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

- 1. スクリーニング用試薬
- 20 ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギプコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

25 ②Gタンパク質共役型レセプター標品

本発明のレセプタータンパク質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%  $CO_2$ 、95% airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [³H] 、 [¹²5] 、 [¹⁴C] 、 [³⁵S] などで標識したリガンド

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液に て1 μMに希釈する。

## ④リガンド標準液

リガンドを0.1% ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1 mMとな るように溶解し、-20℃で保存する。

#### 2. 測定法

15

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプタータンパク質発現C HO細胞を、測定用緩衝液 1 mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各 穴に加える。

10 ② $10^{-3}\sim10^{-10}$  Mの試験化合物溶液を $5~\mu$ 1加えた後、標識リガンドを $5~\mu$ 1加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$  Mのリガンドを $5~\mu$ 1加えておく。

③反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4 mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマンコールター社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB)を次の式で求める。

 $PMB = [ (B-NSB) / (B_0-NSB) ] \times 100$ 

PMB: Percent Maximum Binding

20 B:検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> :最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる 化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性 を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)Gタンパク質共役 型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²\*遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる

20

25

、本発明のレセプタータンパク質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、 発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公 知の化合物であってもよい。

本発明のレセプタータンパク質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター 10 タンパク質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので 、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプタータンパク質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプ タータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるの で、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

15 リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する 生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる 化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って 実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有 する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤 、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物 (例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象職器、症状、投与方法など

25

により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(8) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合 性を変化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニスト) を含有する各種疾病の予 防および/または治療剤

本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば中枢機能、循環機能、 消化機能、心機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる 。従って、本発明のレセプタータンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化 合物 (アゴニスト、アンタゴニスト) や本発明のレセプタータンパク質に対する リガンドは、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防お よび/または治療剤として用いることができる。

例えば、該化合物やリガンドは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ チン、コーンスターチ、トラガント、アラピアゴムのような結合剤、結晶性セル ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨 化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な 5 どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物 は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産 出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他 10 の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナト リウムなど) などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エ タノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコ ール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80™、HCO-50)などと併用 してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補 15 助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

さらに、上記予防・治療剤は適当な薬剤と組み合わせて例えば本発明のレセプ タータンパク質が高発現している臓器や組織を特異的なターゲットとしたDDS 製剤として使用することもできる。

25 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法など により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60 kgとして

20

25

- )においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。
- (9) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩 10 の定量

本発明の抗体は、本発明のレセプタータンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

- 15 (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプタータンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプタータンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量法、
  - (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の 抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を 測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量法 を提供する。
    - 上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプタータンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプタータンパク質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。
  - 本発明のレセプタータンパク質等に対するモノクローナル抗体(以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある)を用いて本発明のレセプタータンパク質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')。 、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質等に

20

25

対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量 (例えば、レセプタータンパク質量) に対応した抗体、抗原もしくは抗体 - 抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法 およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素としては、例表は、「日本 発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例 10 えば、「ロココース (ロココース ) 、 「ロココース ) 、 「ロコース ) 、 「ロココース ) 、 「ロコース ) 、 「ロコース ) 、 「ロココース ) 、 「ロコース ) 、 「コース ) 、 「コー

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、 タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用い る方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロー スなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成 樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を 反応させ (一次反応)、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ (二次反応)た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液 中の本発明のレセプタータンパク質量を定量することができる。一次反応と二次 反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

25

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用 抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させ る等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプタータンパク質等の測定法においては、 - 次反応と二次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプタータンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、一次 反応および二次反応に用いられる抗体は、例えば、二次反応で用いられる抗体が 、レセプタータンパク質のC端部を認識する場合、一次反応で用いられる抗体は 、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

10 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、 競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる 。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させた のち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し( B/F分離)、B、F何れかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本 反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール 、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相 化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固 相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗 体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗 原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗 体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、何れかの相の標識量 を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生 じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈 降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリー などが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件

20

25

- 、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプタータンパク質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和67年発行)、「メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73
- 10 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプタータン パク質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプタータンパク質またその塩を定量することによって、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に 関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプタータンパク質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプタータンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプタータンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプタータンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

(10) 細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド の量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドま

25

たはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセ プタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニ ングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

- 5 (i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
- 10 (ii) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
- 15 (iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する
  - (iv) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド の定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、プタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット

、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗 痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば 、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過し た後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肺、大腸など)、または臓器 から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、 例えば、適当な緩衝液(例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、へペス緩衝 液など)等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤(例えば、 トリトンX100™、ツイーン20™など)などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラ ム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

10 細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く 含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングプレンダーやポリトロン ( Kinematica社製) のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞 腹の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500~3000 rpm)で短時間(通常、約1~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000~30000 rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質等と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く 含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンプロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができ、 25 ウエスタンプロットは公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することができる。

細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を

20

25

変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前(30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前)もしくは一定時間後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、
- 10 (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、 一定時間培養後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましくは 2日後~3日後)、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部 分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド 15 の確認は具体的には以下のようにして行なう。

- (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、心臓、胎盤、肺など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。
  - (iv) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

10

15

20

25

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、Gタンパク質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²+遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(ロ)細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公

知の化合物であってもよい。 該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生 理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生 理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与

対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(11) 細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド の量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤

本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば、心臓または中枢機能 など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防お 15 よび/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することが できる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

25 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な

10

15

20

25

どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、Dーソルビトール、Dーマンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、ポリアルコール(例、ポリソルベート80<sup>™</sup>、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、プタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

20

25

(12) 本発明のレセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に 対する抗体による中和

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の、それらレセプタータンパク質などに対する中和活性とは、すなわち、 該レセプタータンパク質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプタータンパク質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を不活性化することができる。したがって、該レセプタータンパク質の過剰発現などに起因する疾患の予防および/または治療に用いることができる。

(13) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNA を有するトランスジェニック動物の作出

本発明のDNAを用いて、本発明のレセプタータンパク質等を発現するトランスジェニック動物を作出することができる。動物としては、哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、プタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)など(以下、動物と略記する場合がある)が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを導入する場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプタータンパク質等を高産生するDNA導入動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーター

15

20

25

も使用しうるが、好ましくは心臓で特異的に発現する遺伝子のプロモーターが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの導入は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプタータンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプタータンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプタータンパク質等を有する。

本発明のDNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。 さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが導入された動物は、本発明のレセプタータンパク質等が高発 現させられているので、本発明のレセプタータンパク質等に対するアゴニストま たはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプタータンパク質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプタータンパク質等について分析することができる。本発明のレセプタータンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプタータンパク質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、その表示は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号ある

いは当該分野における慣用略号に基づくものである。その例を以下に示す。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

Gly : グリシン

5 Ala : アラニン

Val : バリン

Leu : ロイシン

Ile :イソロイシン

Ser :セリン

10 Thr : スレオニン

Cys : システイン

Met :メチオニン

Glu : グルタミン酸

Asp :アスパラギン酸

15 Lys : リジン

Arg:アルギニン

His : ヒスチジン

Phe :フェニルアラニン

Tyr : チロシン

20 Trp : トリプトファン

Pro :プロリン

Asn:アスパラギン

Gln:グルタミン

pGlu : ピログルタミン酸

25 Me : メチル基

Et:エチル基

Bu : プチル基

Ph :フェニル基

TC : チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Tos:p-トルエンスルフォニル

CHO:ホルミル

5 Bz1 : ベンジル

Cl,Bzl : 2,6-ジクロロベンジル

Bom : ベンジルオキシメチル

Z : ベンジルオキシカルボニル

C1-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル

10 Br-Z : 2ーブロモベンジルオキシカルボニル

Boc: tープトキシカルボニル

DNP : ジニトロフェノール

Trt: トリチル

Bum: tープトキシメチル

15 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

HOBt: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

HOOBt: 3,4-ジヒドロー3-ヒドロキシー4-オキソー1,2,3-ベンゾトリア

ジン

HONB: 1-ヒドロキシー5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド

20 DCC: N, N'ージシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号:1

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR31のアミ

25 ノ酸配列を示す。

配列番号:2

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR31をコードする c DNAの塩基配列を示す。

配列番号:3

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す

# 配列番号: 4

以下の実施例1におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す

5

# 配列番号:5

以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す

# 配列番号:6

10 以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す

配列番号:7

以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプローブの塩基配列を示す。

15 以下の実施例1で得られた形質転換体、大腸菌 (Escherichia coli) TOP10/pCR2.1-hTGR31は、2001年 (平成13年) 3月5日から茨城県つくば 市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産 業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 経済産業省産業技術総合研究所 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に寄託番号FERM BP-7488と して、2001年 (平成13年) 2月20日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16575として寄託されている。

## 実施例

25 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

実施例1 ヒト胎盤のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする c

# DNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト胎盤 c D N A (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー 1 (配列番号:3) およびプライマー2 (配列番号:4) を用いてPCR反応を 行った。該反応における反応液の組成は上記 c DNAを1/10量鋳型として使用し 、Advantage-GC2 Polymerase Mix (クロンテック社(CLONTECH社)) 1/50量、プ 5 ライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー2 (配列番号: 4) を各0.5 μM、 dNTPsを200  $\mu$  M、および酵素に添付のバッファーを1/5量、GC Meltを1/5量加え 、20 µ1の液量とした。PCR反応は、94℃・5分の後、94℃・30秒、60℃・30 秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返し、最後に68℃・5分の伸長反応を行っ た。該PCR反応産物をTAクローニングキット(インビトロジェン社 10 (Invitrogen社)) の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1 (インビトロジェン社 ) ヘサプクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクロ ーンをアンピシリン含有LB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解 析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDN A配列 (配列番号:2) を得た。また、このアミノ酸配列 (配列番号:1) を含 15 有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をTGR31と命名した。また 形質転換体を大腸菌 (Escherichia coli) TOP10/pCR2.1-hTGR31と命名した。

# 実施例2 TGR31のヒト組織における発現分布解析

TGR31のヒト組織における発現分布解析は TaqMan PCR 法を用いることにより調べた。鋳型としては、各臓器の Human Poly A\* RNA (クロンテック社)を SMART PCR cDNA Synthesis Kit (クロンテック社) で調製した c DNA ライブラリーを用いた。PCR 用プライマーとしてプライマー1 (配列:5)及びプライマー2 (配列番号:6)を、また配列番号:7を有するプローブを使用して TaqMan PCR を行った。該反応における反応液組成は、TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン)を 12.5 1、10 μ M のプライマー1とプライマー2を各 0.5 μ l、5 μ M のプローブを 1 μ l、鋳型を 2 μ l、蒸留水を8.5 μ l の合計 25 μ l であり、P C R 反応は、50℃・2分、95℃・10分保持した後、95℃・15 秒、60℃・1分のサイクルを 40 回繰り返した。得られた結果より

標準化に用いた  $\beta$ -アクチン  $1\times10^5$  当たりのコピー数として算出した値を図2に示す。これより TGR 3 1 の発現量は、胎盤・肝臓で高く発現していることがわかった。

# 5 産業上の利用可能性・

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体)は、①リガンド(アゴニスト)の決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプタータンパク質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作出または⑧遺伝子治療剤等の医薬等として用いることができる。

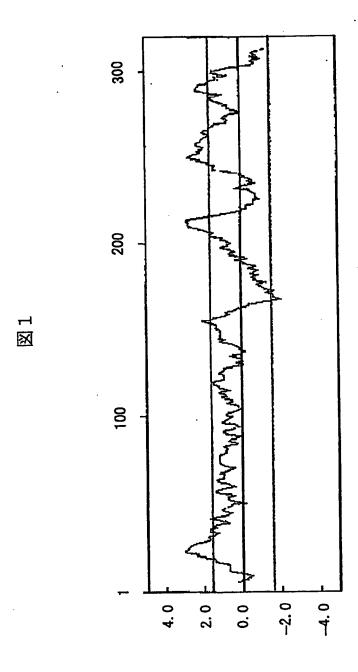
15

# 請求の範囲

- 1. 配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩。
- 2. 配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有する請求項1記載のGタンパク 質共役型レセプタータンパク質。
- 3. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
- 10 4. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするポリ ヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
  - 5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
  - 6. 配列番号:2で表される塩基配列を含有する請求項5記載のDNA。
  - 7. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- 15 8. 請求項7記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
  - 9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法。
- 10. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項 20 3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。
  - 11. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のシグナル伝達 を不活性化する中和抗体である請求項10記載の抗体。
  - 12. 請求項10記載の抗体を含有してなる診断薬。
  - 13. 請求項10記載の抗体を含有してなる医薬。
- 25 14. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項 3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることにより得られうる請求項1 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド。 15. 請求項14記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩 に対するリガンドを含有してなる医薬。

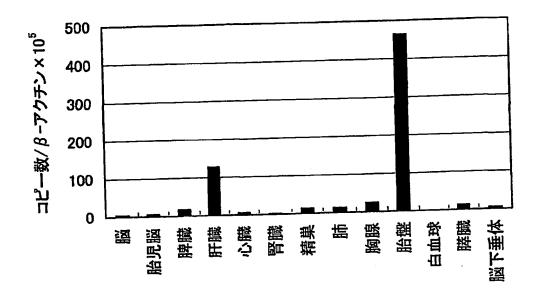
- 16. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項 3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項1記載 のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決 定方法。
- 5 17. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項 3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とするリガンドと請 求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性 を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 18. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項 3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするリガンドと 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合 性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
  - 19. 請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型
- 15 レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。 20. 請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニ ング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型 レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩 を含有してなる医薬。
- 20 21. 請求項4記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。
  - 22. 請求項4記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド。
- 23. 請求項4記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とす 25 る請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のmRNAの定量方 法。
  - 24. 請求項10記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の定量方法。
  - 25. 請求項23または請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする請

- 求項1記載のGタンパク質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法。
- 26. 請求項23記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 5 27. 請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における請求 項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物また はその塩のスクリーニング方法。
  - 28. 請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載の Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはそ の塩。
  - 29. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物 またはその塩。
  - 30. 請求項28記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 15 31. 請求項29記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
  - 32. 中枢性疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、循環器疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、炎症性疾患または感染症の予防・治療剤である請求項 13、15、20、30または31記載の医薬。
- 33. 哺乳動物に対して、請求項19、28または29記載の化合物またはその 20 塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、 循環器疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、炎症性疾患または感染 症の予防・治療方法。
- 34. 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、循環器疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患、炎症性疾患または感染症の予防・治療剤を製造するための請求項19、28または29記載の化合物またはその塩の使用。



3/21/05, EAST Version: 2.0.1.4

図2



1/5

# SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein-Coupled Receptor and its DNA

<130> P01-0282PCT

<150> JP 2001-10814

<151> 2001-01-18

<150> JP 2001-102558

<151> 2001–03–30

<160> 7

<210> 1

<211> 318

<212> PRT

<213> Human

**<400>** 1

Met Asn Gly Asp His Met Val Leu Gly Ser Ser Val Thr Asp Lys Lys 15 5

10

Ala Ile Ile Leu Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Ile 30 20 25

Ala Gly Asn Gly Phe Ile Thr Ala Ala Leu Gly Val Glu Trp Val Leu

45 35

Arg Arg Met Leu Leu Pro Cys Asp Lys Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala

WO 02/057309 PCT/JP02/00271

	50					55					60				
Ser	Arg	Phe	Cys	Leu	Gln	Ser	Val	Val	Met	Gly	Lys	Thr	Ile	Tyr	Val
65					70					75					80
Phe	Leu	His	Pro	Met	Ala	Phe	Pro	Tyr	Asn	Pro	Val	Leu	Gln	Phe	Leu
				85					90					95	
Ala	Phe	Gln	Trp	Asp	Phe	Leu	Asn	Ala	Ala	Thr	Leu	Trp	Ser	Ser	Thr
			100					105					110		
Trp	Leu	Ser	Val	Phe	Tyr	Cys	Val	Lys	Ile	Ala	Thr	Phe	Thr	His	Pro
		115					120					125			
Val	Phe	Phe	Trp	Leu	Lys	His	Lys	Leu	Ser	Gly	Trp	Leu	Pro	Trp	Met
	130					135				•	140				
Leu	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	Leu	Ser	Ser	Phe	Thr	Thr	Ile	Leu	Phe	Phe
145					150					155					160
Ile	Gly	Asn	His	Arg	Met	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Gln
				165					170	)				175	;
Pro	Trp	Asn	Val	Thr	Gly	Asp	Ser	Ile	Arg	g Ser	Туг	Cys	Glu	Lys	Phe
			180	)				185	i				190	)	
Tyr	Leu	Phe	Pro	Leu	Lys	Met	: Ile	Thr	Tr	Thi	. Met	Pro	) Thr	Ala	Val
		195	5				200	ı				205	;		
Phe	Phe	: Ile	e Cys	Met	: Ile	e Lev	ı Leu	Ile	Thi	r Sea	r Lei	ı Gly	/ Are	, His	s Arg
	210					215					220				
Lys	: Lys	s Ala	a Let	ı Let	ı Thi	r Thi	r Sei	Gly	Phe	e Ar	g Glu	ı Pro	Sei	· Val	l Gln
225					230					23					240
Ala	Hi:	s Ile	e Ly	s Ala	a Let	u Let	u Ala	ı Let	ı Lei	u Se	r Pho	e Ala	a Met	t Let	u Phe
				24	5				25	0				25	5
Ile	s Se	r Ty	r Ph	e Lei	u Se	r Le	u Val	l Ph	e Se	r Al	a Al	a Gl	y Il	e Ph	e Pro
			26	0				26	5				27	0	
Pro	Le	u As	p Ph	e Ly	s Ph	e Tr	p Va	l Tr	p Gl	u Se	r Va	1 I1	е Ту	r Le	u Cys
		27	5				28	0				28	5		

Ala Ala Val His Pro Ile Ile Leu Leu Phe Ser Asn Cys Arg Leu Arg
290 295 300

Ala Val Leu Lys Ser Arg Arg Ser Ser Arg Cys Gly Thr Pro

310

<210> 2

305

<211> 954

<212> DNA

<213> Human

#### <400> 2

60 atgaatggag accacatggt tctaggatct tcggtgactg acaagaaggc catcatcttg 120 gttaccattt tactcctttt acgcctggta gcaatagcag gcaatggctt catcactgct gctctgggcg tggagtgggt gctacggaga atgttgttgc cttgtgataa gttattggtt 180 240 agcctagggg cctctcgctt ctgtctgcag tcagtggtaa tgggtaagac catttatgtt ttettgcate cgatggcett cccatacaac cctgtactgc agtttetage tttecagtgg 300 gacttcctga atgctgccac cttatggtcc tctacctggc tcagtgtctt ctattgtgtg 360 aaaattgcta ccttcaccca ccctgtcttc ttctggctaa agcacaagtt gtctgggtgg 420 ctaccatgga tgctcttcag ctctgtaggg ctctccagct tcaccaccat tctatttttc 480 540 ataggcaacc acagaatgta tcagaactat ttaaggaacc atctacaacc ttggaatgtc actggcgata gcatacggag ctactgtgag aaattctatc tcttccctct aaaaatgatt 600 acttggacaa tgcccactgc tgtctttttc atttgcatga ttttgctcat cacatctctg 660 ggaagacaca ggaagaaggc tctccttaca acctcaggat tccgagagcc cagtgtgcag 720 gcacacataa aggctctgct ggctctcctc tcttttgcca tgctcttcat ctcatatttc 780 ctgtcactgg tgttcagtgc tgcaggtatt tttccacctc tggactttaa attctgggtg 840 tgggagtcag tgatttatct gtgtgcagca gttcacccca tcattctgct cttcagcaac 900 tgcaggctga gagctgtgct gaagagtcgc cgttcctcaa ggtgtgggac acct 954

⟨210⟩ 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

gtcgacatga atggagacca catggttcta gg 32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

(213) Artificial Sequence

⟨220⟩

<223> Primer

⟨400⟩ 4

tactagttca aggtgtccca caccttgagg aa 32

⟨210⟩ 5

⟨211⟩ 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

PCT/JP02/00271

5/5

<400> 5

ttacaacctc aggattccga gag

23

⟨210⟩ 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

agcatggcaa aagagaggag ag

22

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

⟨400⟩ 7

tgcaggcaca cataaaggct ctgctg

26

International application No.
PCT/JP02/00271

		<u></u>				
	NFICATION OF SUBJECT MATTER extra sheet.)					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
	S SEARCHED					
	ocumentation searched (classification system followed extra sheet.)	by classification symbols)				
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the	extent that such documents are included	in the fields searched			
WPID GenB	ata base consulted during the international search (name S/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE (ST. ank/EMBL/DDBJ/GeneSeqsProt/PIR/GeneSeq		rch terms used)			
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where ap	·	Relevant to claim No.			
Х	Guo-Xi X. et al., Expression can a seven-helix receptor from faffinity for opioid ligands, USA, 1992, Vol.89, No.9, page	fuman placenta with Proc. Natl. Acad. Sci.	1-18,21-27,32, 34			
<b>x</b>	Adamou J.E. et al., Cloning a characterization of the human peptide (VIP)-2 receptor, Bic Commun., 1995, Vol.209, No.2,	vasoactive intestinal ochem. Biophys. Res.	1-18,21-27,32, 34			
х	Hayzer D.J. et al., Cloning an endothelin receptor: subtype A, Vol.304, No.4, pages 231 to 2	, Am. J. Med. Sci., 1992,	1-18,21-27,32, 34			
X	JP, 2000-312590, A (Takeda C Ltd.), 14 November, 2000 (14.11.00), Claims; Par. No. [0048] & WO 00/24890 A1		14,15,32			
× Furth	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.				
"A" docum conside "E" earlier date "L" docum cited to special "O" docum means "P" docum than th	categories of cited documents: ent defining the general state of the art which is not red to be of particular relevance document but published on or after the international filing ent which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or other ent published prior to the international filing date but later e priority date claimed actual completion of the international search	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family  Date of mailing of the international search report				
08 April, 2002 (08.04.02) 16 April, 2002 (16.04.02)						
	nailing address of the ISA/ nese Patent Office	Authorized officer				
Facsimile N	ο.	Telephone No.				

International application No.
PCT/JP02/00271

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Х	JP, 2000-295995, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 24 October, 2000 (24.10.00), Claims; Par. No. [0008] & WO 00/35953 A1	14,15,32
х	JP, 2000-279183, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 10 October, 2000 (10.10.00), Claims; Par. No. [0007] & WO 00/24891 A1	14,15,32
х	JP, 2000-189174, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 11 July, 2000 (11.07.00), Claims; Par. No. [0007] & WO 00/20456 Al	14,15,32
х	JP, 2000-175691, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 27 June, 2000 (27.06.00), Claims; Par. No. [0007] & WO 00/20580 A1	14,15,32
X	<pre>JP, 2000-175690, A (Kazusa DNA Research Institute Foundation), 27 June, 2000 (27.06.00), Claims; Par. No. [0008] &amp; WO 00/05264 A1</pre>	14,15,32
х	JP, 2000-166576, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 20 June, 2000 (20.06.00), Claims; Par. No. [0007] & WO 00/20455 A1	14,15,32
A	Cikos S. et al., Sequence and tissue distribution of a novel G-protein-coupled receptor expressed prominently in human placenta, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, Vol.256, No.2, pages 352 to 356	1-18,21-27,32, 34
A	The Sanger Centre et al., Toward a complete human genome sequence, Genome Res., 1998, Vol.8, No.11, pages 1097 to 1108	1-18,21-27,32, 34

Form PCT/ISA/210 (conti3/21/05, EAST Version: 2.0.1.4

International application No.
PCT/JP02/00271

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. X Claims Nos.: 33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
This claim involves therapeutic methods.
2 Fill China Nos. 10 20 28-21
2. X Claims Nos.: 19, 20, 28-31 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an
extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
·
1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable
claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers
only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
·
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
, and an
Remark on Protest
No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.

PCT/JP02/00271

# Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/705, C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/28, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/53, G01N33/566, A61K38/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P3/00, A61P5/00, A61P9/00, A61P11/00, A61P25/28, A61P35/00, A61P37/00

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

#### Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/705, C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/28, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/53, G01N33/566, A61K38/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P3/00, A61P5/00, A61P9/00, A61P11/00, A61P25/28, A61P35/00, A61P37/00

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

#### Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

The substance described in claim 19 is specified as a compound or its salt capable of altering the binding properties of a ligand to the G protein-coupled receptor protein as set forth in claim 1 or its salt which is obtained by screening with the use of "the screening method as set forth in claim 17 or the screening kit as set forth in claim 18". Thus, it involves any substances obtained by this screening method in its scope.

However, no specific substance obtained by this screening method is disclosed in the description. Thus, claim 19 is neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific substances are involved in the scope thereof and what are not. Namely, claim 19 is described in an extremely unclear manner.

Such being the case, no meaningful search can be made on the invention as set forth in claim 19.

For the same reason, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in claims 20, 28 and 29.

For the same reason, no meaningful search can be made on the invention as set forth in claim 30 depending on claim 28.

For the same reason, no meaningful search can be made on the invention as set forth in claim 31 depending on claim 29.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1<sup>2</sup> C07K14/705, C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/28, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/53, G01N33/566, A61K38/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P3/00, A61P5/00, A61P9/00, A61P11/00, A61P35/00, A61P37/00

### B. 調査を行った分野

#### 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1<sup>7</sup> C07K14/705, C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/28, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/53, G01N33/566, A61K38/00, A61K45/00, A61P1/00, A61P3/00, A61P5/00, A61P9/00, A61P11/00, A61P35/28, A61P35/00, A61P37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE (STN), JICST (JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

引用文献の カテゴリー*	3と認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Guo-Xi X. et al., Expression cloning of cDNA encoding a seve n-helix receptor from human placenta with affinity for opioid ligands, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1992, Vol. 89, No. 9, pages 4124-4128	1-18, 21-27, 32, 34
<b>X</b>	Adamou J.E. et al., Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, Vol. 209, No. 2, peges 385-392	1-18, 21-27, 32, 34

#### 区欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

- \* 引用文献のカテゴリー
- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す もの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日 以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する 文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって 出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論 の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明 の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに よって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 08.04.02 国際調査報告の発送日 16.04.02 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 事便番号100-8915 東京都千代田区館が関三丁目4番3号 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き).	関連すると認められる文献	
引用文献の		関連する
カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	Hayzer D. J. et al., Cloning and expression of a human endothelin receptor: subtype A, Am. J. Med. Sci., 1992, Vol. 304, No. 4, pages 231-238	1-18, 21-27, 32, 34
<b>X</b> .	JP 2000-312590 A (武田薬品工業株式会社) 2000. 11. 14, 特許請求の範囲, 【0048】 & WO 00/24890 A1	14, 15, 32
х	JP 2000-295995 A (武田薬品工業株式会社) 2000.10.24,特許請求の範囲,【0008】 & WO 00/35953 A1	14, 15, 32
x	JP 2000-279183 A (武田薬品工業株式会社) 2000.10.10, 特許請求の範囲, 【0007】 & WO 00/24891 A1	14, 15, 32
x	JP 2000-189174 A (武田薬品工業株式会社) 2000.07.11,特許請求の範囲,【0007】 & WO 00/20456 A1	14, 15, 32
<b>X</b> .	JP 2000-175691 A (武田薬品工業株式会社) 2000.06.27,特許請求の範囲,【0007】 & WO 00/20580 A1	14, 15, 32
x	JP 2000-175690 A (財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所) 2000.06.27,特許請求の範囲, 【0008】 & WO 00/05264 A1	14, 15, 32
x	JP 2000-166576 A (武田薬品工業株式会社) 2000 06.20,特許請求の範囲,【0007】 & WO 00/20455 A1	14, 15, 32
А	Cikos S. et al., Sequence and tissue distribution of a novel G-protein-coupled receptor expressed prominently in human placenta, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, Vol. 256, No. 2, pages 352-356	1-18, 21-27, 32, 34
A	The Sanger Centre et al., Toward a complete human genome sequence, Genome Res., 1998, Vol. 8, No. 11, pages 1097-1108	1-18, 21-27, 32, 34

第Ⅰ欄	請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き) 第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作
成しなが	The transfer of the control of the c
1. X	請求の範囲 <u>33</u> は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。 つまり、
	人の治療方法を含むものである
2. X	請求の範囲 <u>19-20, 28-31</u> は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
	(特別頁参照)
3. 🗌	請求の範囲は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に 従って記載されていない。
第Ⅱ欄	発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)
次に进	べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
1. []	出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求 の範囲について作成した。
2. 🔲	追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追 加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 🗌	出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
	·
4. 🗌	出願人が必要な追加調査手教料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
ı	
追加調子	を手数料の異議の申立てに関する注意
	」 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 ] 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

# (第2頁第1欄2.より続く)

請求の範囲19に記載の物質は、「請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キット」を用いてスクリーニングを行うことにより得られる、リガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩と特定されており、当該スクリーニング方法で得られるあらゆる物質を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該スクリーニング方法で得られる物質としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲19は、明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても、具体的にどのような物質が包含され、どのような物質が包含されないのかが全く不明であって、請求の範囲19の記載は著しく不明確である。

したがって、請求の範囲19に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

請求の範囲20、28、29に記載された発明についても、同様の理由により、有意義な調査をすることができない。

請求の範囲28を引用する請求の範囲30についても、同様の理由により、有意義な調査をすることができない。

請求の範囲29を引用する請求の範囲31についても、同様の理由により、有意義な調査をすることができない。